



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado Biología

Identificación de inhibidores de la proteasa pro-inflamatoria granzima A mediante cribado de librerías de compuestos químicos.

Identification of inhibitors of the pro-inflammatory protease
granzyme A through the screening of chemical compounds sets.

Autores:

Mario Navarro Domínguez

Dirigido por:

Dr. Julián Pardo Jimeno.

Llpsy Santiago García.

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

Centro de Investigación Biomédica de Aragón

Julio 2019

1. Resumen	1
2. Introducción y Antecedentes	2
El sistema inmune	2
Inmunidad innata	2
Inmunidad adaptativa	2
Citotoxicidad mediada por células	2
Mecanismos de acción de los CTL y células NK	3
Exocitosis granular	3
Perforina	4
Granulisin	4
Granzimas	4
Granzima B	5
Granzima A	5
Inhibidores de granzimas: familia de serpinas	6
Búsqueda de nuevos inhibidores: Ensayos “High-Throughput Screening”	7
3. Objetivos	7
4. Materiales y métodos	8
4.1 Expresión y purificación de Granzima A recombinante de ratón en sistema de expresión <i>E. coli</i>.	8
4.1.1 Expresión de granzima A en <i>E. coli</i>	8
4.1.2 Purificación de granzima A	8
4.1.3 Activación de la granzima A	9
4.1.4 Ensayo de actividad de granzima A	9
4.2 Cribado de posibles inhibidores de granzima A de ratón en librerías de compuestos químicos.	10
4.2.1 Librería “Approved Oncology Drugs Set VIII” (NCI)	10
4.2.2 Librería “Mechanistic Set IV” (NCI)	11
4.3 Determinación de la capacidad de los compuestos seleccionados de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos estimulados con granzima A.	11

4.3.1	Diferenciación de Macrófagos pro-inflamatorios M1 derivados de médula ósea	11
4.3.2	Análisis de producción de IL6 por macrófagos M1 en presencia de granzima A y frente a diversos inhibidores	12
4.4	Análisis de proteínas	12
4.4.1	Análisis de sobreexpresión de granzima A mediante inmunodetección Western-Blot	12
4.4.2	Cuantificación de IL-6 por ELISA	13
5.	Resultados y discusión	14
5.1	Expresión y purificación de gmzA recombinante de ratón en E. coli	17
5.1.1	Análisis de la sobreexpresión de granzima A	14
5.1.2	Determinación de fracciones eluidas que contienen granzima A	15
5.1.3	Ensayo de actividad de granzima A	15
5.1.4	Cuantificación de sobreexpresión por densitometría	16
5.1.5	Identificación de granzima A mediante técnica Western-Blott	17
5.2	Cribado de librerías de compuestos químicos para identificación de posibles inhibidores de granzima A de ratón	18
5.2.1	Resultados ensayos de confirmación	18
5.3	Análisis de producción de IL-6 por macrófagos M1 en presencia de granzima A y granzima A con diversos inhibidores	20
6.	Conclusiones	21
7.	Bibliografía	22
8.	Anexos	26
8.1	Abreviaturas	26
8.2	Estructura química de compuestos con capacidad de inhibición de granzima A	27

1. Resumen

La perpetuación de la respuesta inflamatoria conduce a la aparición de procesos patológicos, entre los que se incluyen el cáncer y trastornos autoinmunes. Recientemente se ha descrito que la granzima A (gzmA), una serín-proteasa expresada en los gránulos de linfocitos T citotóxicos (T CD8+) y células Natural Killer (NK), tiene un papel eminentemente pro-inflamatorio, regulando la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF α en macrófagos y otros grupos celulares. Se ha demostrado que la gzmA juega un papel fundamental en procesos inflamatorios como artritis reumatoide, sepsis bacteriana, colitis ulcerosa y cáncer colorrectal. Además, se ha comprobado que su ausencia no produce efectos inmunosupresores. Es por esto que la búsqueda de posibles inhibidores de gzmA es de gran interés, con el fin de desarrollar nuevos tratamientos que atenúen selectivamente la inflamación sin provocar inmunosupresión. En este trabajo, se ha realizado un cribado de compuestos químicos con el fin de identificar posibles inhibidores de gzmA, utilizando distintas librerías de compuestos químicos. Para ello, se llevó a cabo la sobreexpresión y purificación de gzmA recombinante de ratón en un sistema de expresión en *Escherichia coli*. Con la gzmA obtenida, se realizaron ensayos de inhibición con un total de 533 compuestos químicos diferentes. Los compuestos que inhibieron *in vitro* la actividad enzimática de gzmA, fueron seleccionados para evaluar si eran capaces de reducir la producción de IL-6 inducida por gzmA en macrófagos. Únicamente 2 compuestos pudieron ser seleccionados como posibles inhibidores, pero finalmente ninguno mostró capacidad de inhibir la producción de IL-6 mediada por gzmA en macrófagos.

Abstract

The perpetuation of inflammatory response can lead to the appearance of pathological processes, such as cancer or autoimmune disorders. Recently, granzyme A (gzmA), a serine-protease mainly expressed on the granules of cytotoxic T-lymphocytes (T CD8+) and Natural Killer (NK) cells, has been described to possess an eminently pro-inflammatory role, regulating the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF α in macrophages and different cell groups. Moreover, it has been demonstrated that gzmA plays a significant role in inflammatory processes such as rheumatoid arthritis, bacterial sepsis, ulcerative colitis and colon cancer. Additionally, it has been shown that its absence does not produce immunosuppressive effects. For these reasons, the search of possible gzmA inhibitors is of great interest, in order to develop new treatments to selectively attenuate inflammation without leading to immunosuppression. In this project, we have conducted the screening of different compounds sets in order to identify possible inhibitors. First, mouse recombinant gzmA was overexpressed and purified from a *Escherichia coli* expression system. With the obtained gzmA, we performed several inhibition assays with a total of 533 different chemical compounds. Those that showed *in vitro* gzmA inhibitory capacity were selected to evaluate if they were capable to reduce the gzmA induced IL-6 expression in bone marrow derived macrophages. Ultimately, only 2 compounds were identified as possible gzmA inhibitors, but none of those showed the capacity to reduce gzmA mediated IL-6 production.

2. Introducción y antecedentes.

El sistema inmune

El sistema inmunitario permite mantener la homeostasis o equilibrio interno frente a agresiones de agentes tanto exógenos (patógenos, agentes contaminantes o radiaciones) como endógenos (células transformadas). Genera una gran variabilidad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar de forma específica agentes extraños, siendo altamente adaptable y ofreciendo protección al organismo contra invasores muy diversos.

El sistema inmune puede dividirse desde el punto de vista funcional en dos niveles: la inmunidad innata (natural o inespecífico) y la inmunidad adquirida (adaptativo o específico).

Inmunidad innata

Supone una primera línea de defensa que actúa de forma genérica. La respuesta innata incluye las barreras físicas y anatómicas del cuerpo, células fagocíticas, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, basófilos, eosinófilos y algunas células citotóxicas.

Inmunidad adaptativa

Establece una respuesta selectiva que permite generar memoria inmunitaria. La respuesta adaptativa depende de los linfocitos y anticuerpos; y de manera clásica se divide a su vez en dos tipos de respuestas, la humoral y la celular.

La respuesta humoral presenta como efectores a los anticuerpos, los cuales son sintetizados y secretados por linfocitos B diferenciados a células plasmáticas tras su interacción con un antígeno libre o soluble (Alberts et al., 2002).

La respuesta celular se basa en la acción de los linfocitos T. Estos linfocitos a su vez se clasifican en linfocitos T_H “helper” o colaboradores (CD4+), los cuales activan y regulan a otras células del sistema inmune; y los linfocitos T_c citotóxicos (CD8+), que eliminarían a células diana mediante mecanismos de citotoxicidad.

Citotoxicidad mediada por células

La citotoxicidad es la capacidad que tienen determinadas células del sistema inmune de llevar a cabo reacciones citotóxicas que eliminan o destruyen células extrañas y aquellas propias del organismo que se encuentren infectadas, alteradas o transformadas. Es un componente esencial tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta adaptativa (Voskoboinik, Whisstock, & Trapani, 2015). Las principales células citotóxicas son los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales (NK).

Los CTL se generan por la activación inmunitaria de las células T_c CD8+. Son capaces de eliminar células mediante la liberación de moléculas tóxicas, como respuesta a la interacción específica de un antígeno presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) con el receptor del linfocito T (TCR) (Fooksman et al., 2010). Cuando las células infectadas o transformadas exhiben antígenos en el MHC I, los CTLs pueden reconocerlo y eliminar dichas células. No obstante, para la correcta activación de las células T CD8+, no solo se requiere el reconocimiento de antígenos por el TCR, sino también de la presencia de señales co-estimuladoras por las células presentadoras de antígenos (APC) y de una tercera señal basada en liberación de citoquinas, IL-2 por parte de los linfocitos T_H, e IL-12 por parte de células dendríticas (Mescher et al., 2006).

Por otro lado, las células NK son una población de linfocitos granulares que poseen actividad citotóxica contra una amplia gama de células tumorales y contra células infectadas por determinados virus. Actúan de manera inespecífica ya que no presentan receptores de antígenos, por lo que forman parte de la respuesta inmunitaria innata. Las células NK presentan en su superficie tanto receptores de activación como de inhibición, siendo el balance entre las señales activadoras e inhibitoras lo que permite distinguir las células normales de las infectadas (Bakker, Wu, Phillips, & Lanier, 2000). Además, presentan en su membrana receptores CD16 para la fracción Fc de los anticuerpos (P. Anderson et al., 1990). Esto permite a las células NK reconocer anticuerpos fijados en células diana, lo que conlleva a su activación y acción citotóxica (Dourmashkin, Deteix, Simone, & Henkart, 1980). Este es un caso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), donde la especificidad del anticuerpo las dirige sobre la diana.

Mecanismos de acción de los CTLs y células NK

A pesar de que la forma de activación de los CTL y las células NK sea diferente, sus mecanismos de acción son los mismos, ejerciendo sus funciones citotóxicas a través de tres mecanismos comunes (Julián Pardo et al., 2009):

- Secreción de citoquinas como $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$, reconocidos por receptores de INF (INFR) y TNF (TNFR)
- Inducción de la ruta de apoptosis exógena o extrínseca mediada por la expresión y unión de ligandos mortales (FasL, Apo2L/TRAIL) a los receptores correspondientes expresados en las células diana (Fas/CD95, DR4/DR5).
- Exocitosis granular, basado en la degranulación de vesículas que contienen las moléculas tóxicas, de forma dirigida sobre la zona de sinapsis inmunológica.

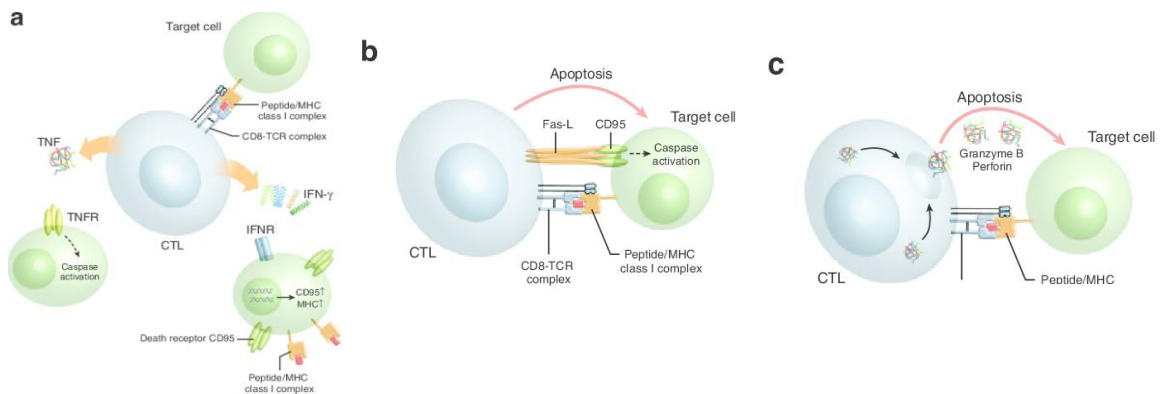


Figura 2.1 Mecanismos de acción de los CTL y células NK. La acción de las células efectoras se produce a través de 3 mecanismos: (a) secreción de citoquinas $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$; (b) ruta de apoptosis exógena a través de la unión de ligandos mortales (FasL-Fas/CD95) y (c) a través de la exocitosis granular. Imagen adaptada de: Andersen, Schrama, thor Straten, & Becker, 2006.

Exocitosis granular

El proceso de exocitosis granular es el mecanismo por el cual se produce la degranulación de las vesículas de los CTL y células NK. Una vez las células citotóxicas interactúan con la célula diana, se produce un tráfico de gránulos citotóxicos hacia la zona de sinapsis inmunológica, conduciendo a la liberación de su contenido al medio extracelular, y provocando la muerte por

apoptosis de las células dianas (Desiree A Anthony et al., 2010; Ritter, Angus, & Griffiths, 2013). Los gránulos de las células citotóxicas contienen una gran cantidad de proteínas, algunas de ellas de origen lisosomal, siendo las proteínas más abundantes y de mayor relevancia la perforina, la granzulina y las granzimas (Page, Darmon, Uellner, & Griffiths, 1998; Voskoboinik et al., 2015).

Perforina

La perforina (Perf) es una proteína de 67 kDa, caracterizada por la formación de poros transmembrana e inducción de lisis a altas concentraciones, actuando a pH neutro y en presencia de calcio (D Masson & Tschopp, 1985; J. D. Young & Cohn, 1986).

Presenta cierta homología, tanto estructural como de secuencia, con el componente C9 de ataque de membrana del sistema de complemento, por lo que se postula que la perf polimeriza sobre la membrana de la célula diana para formar poros que facilitan la entrada de los demás componentes presentes en los gránulos citotóxicos (Lopez et al., 2013; Tschopp, Masson, & Stanley, 1986; J. Young, Cohn, & Podack, 1986). No obstante, existe cierta controversia con respecto a si la entrada a la célula de dichos componentes se debe a la difusión a través de los poros, o sino más bien a un proceso de endocitosis en un intento de reparar la membrana alterada. Por acción de la perf, se produce un rápido flujo de entrada de calcio extracelular hacia el interior, que actúa como señal de daño, induciendo la endocitosis del área afectada. (Desiree A Anthony et al., 2010; Baran et al., 2009).

Granzulina

La granzulina es una toxina antibacteriana que actúa sobre bacterias intracelulares, expresada por CTLs y células NK de primates y rumiantes, pero no en roedores (Peña, Hanson, Carr, Goralski, & Krensky, 1997).

La entrada de granzulina a las células depende de la acción de la perf, difunde a través de los poros formados, y una vez en el interior, permite la eliminación de bacterias patógenas intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*, afectando a la integridad de sus membranas (D. H. Anderson et al., 2003; Stenger et al., 1998).

Granzimas

Las granzimas (gzms) son una familia de serín-proteasas mayormente producidas y secretadas por las células NK y los CTLs. Descubiertas en los años 80 (Danièle Masson & Tschopp, 1987), se han identificado hasta la fecha 5 tipos de gzms en humanos (A, B, M, H, K) y 10 tipos en ratón (A, B, C, D, E, F, G, K, M y N) (Grossman et al., 2003). De todas ellas, son la granzima A (gzmA) y la granzima B (gzmb) las más abundantes, además de ser las más estudiadas y mejor caracterizadas (Kaiserman et al., 2006a).

Las gzms se sintetizan en forma de zimógeno, en su forma inactiva, y su procesamiento requiere de dos pasos (Desiree A Anthony et al., 2010). En primer lugar, las gzms son dirigidas al retículo endoplasmático (RE) y de Golgi, donde se elimina el péptido señal o secuencia líder, dejando un dipéptido en el extremo amino-terminal. Además, se adiciona manosa-6-fosfato como señal de transporte lisosomal (Griffiths & Isaaz, 1993). Posteriormente, ya en los gránulos citotóxicos, se escinde el dipéptido, permitiendo la correcta activación de la proteína. La activación de las gzms es llevada a cabo por la peptidasa Cathepsina C, de expresión constitutiva en los gránulos (Kummer, Kamp, Citarella, Horrevoets, & Hack, 1996). No obstante, mientras las gzms se encuentran en el interior de las vesículas, debido al pH ácido, se mantienen en estado inactivo, adquiriendo capacidad proteolítica cuando son liberadas al espacio extracelular (Trapani, 2001).

Históricamente, las gzms se han asociado a procesos citotóxicos, induciendo la muerte celular o apoptosis de células diana, como células tumorales o aquellas infectadas por bacterias y virus, a través del mecanismo conocido como exocitosis granular. Sin embargo, esta función podría ser prácticamente atribuible en su totalidad a la gzmB, y existen cada vez más evidencias de que el rol citotóxico del resto de las gzms es, en verdad, muy limitado (Joeckel & Bird, 2014). Numerosos artículos y estudios recientes sugieren que las gzms tienen un papel destacado en la mediación de procesos no-citotóxicos, como la regulación de la inflamación, modificación de matriz extracelular, promover la migración de linfocitos, señalización celular, inducción en la producción de citoquinas... (Arias et al., 2017; Hiebert, Wu, & Granville, 2013; Romero & Andrade, 2008), aunque la función específica de cada una de las gzms todavía no esté completamente definida.

- Granzima B

La gzmB es una proteasa con especificidad de corte en aspártico. Existe un consenso general sobre el papel clave de esta granzima en la inducción de apoptosis, la cual se puede llevar cabo por dos mecanismos: a través de la vía apoptótica endógena o mitocondrial, o activando directamente a las caspasas (Lieberman, 2003; Metkar et al., 2003; J Pardo et al., 2008; Julián Pardo et al., 2009).

Además se empieza a relacionar también con procesos inflamatorios, coagulación, reparación tisular y funciones antivirales e inmunosupresoras (Arias et al., 2017; Martinez-Lostao, Anel, & Pardo, 2015; Julián Pardo et al., 2009).

- Granzima A

La gzmA, junto a la gzmB, es la más abundante. Corta de forma preferencial tras los amino ácidos arginina (Arg) y lisina (Lys), por lo que es clasificada como una triptasa (Desiree A Anthony et al., 2010). Durante décadas se le ha atribuido un papel citotóxico, como sucedió con el resto de gzms, pero estudios recientes sugieren que su función principal es la regulación de la respuesta inflamatoria (van Eck, Shan, Meeldijk, Hack, & Bovenschen, 2017; Wensink, Hack, & Bovenschen, 2015).

La citotoxicidad de la gzmA se determinó *in vitro* a través de modelos heterólogos, utilizando gzmA recombinante de ratón o de rata, junto con perf de rata, y tomando células de ratón como dianas (Hayes, Berrebi, & Henkart, 1989; Shi, Kraut, Aebersold, & Greenberg, 1992). En estos experimentos se observó que mientras la gzmB inducía muerte celular en tan solo 4 h, con gzmA se necesitaban 20 h (Shi, Kam, Powers, Aebersold, & Greenberg, 1992; Shi, Kraut, et al., 1992). Por otro lado, cuando se utilizó gzmA en modelos autólogos (perf, gzmA y células diana de la misma especie), no se pudo observar muerte celular inducida por gzmA, ni siquiera a concentración micromolar; mientras que con la gzmB se inducía muerte celular a concentraciones nanomolares (Kaiserman et al., 2006; Metkar et al., 2008).

La gzmA promueve apoptosis de forma independiente a la vía de las caspasas (a diferencia de la gzmB) (Martinvalet, Dykxhoorn, Ferrini, & Lieberman, 2008). Es internalizada en la célula diana por acción de la perf. Una vez en el interior afecta a la mitocondria, disruptiendo la cadena de transporte electrónica, lo que conduce a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lucken-Ardjomande & Martinou, 2008). El aumento de ROS promueve la translocación del complejo SET desde el RE al núcleo, donde la gzmA es capaz de degradar tres componentes del mismo, liberándose a su vez dos exonucleasas, que empiezan a generar mellas en el DNA (Chowdhury et al., 2006). Además la gzmA actúa sobre varias histonas y otras

proteínas de la lámina nuclear, contribuyendo a la degradación del núcleo (Desiree A Anthony et al., 2010; Fan, Beresford, Oh, Zhang, & Lieberman, 2003).

Sin embargo, como ya hemos mencionado anteriormente, este papel citotóxico es controvertido. Existen numerosas evidencias de que la gzmA está particularmente relacionada con la regulación de la respuesta inflamatoria. La gzmA favorece la producción y procesamiento de citoquinas pro-inflamatorias, induciendo la secreción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos e IL-8 en células epiteliales (Sower, Klimpel, Hanna, & Froelich, 1996); además de IL-6, IL-1 β y TNF α en macrófagos (Metkar et al., 2008), tal como se ha demostrado en varios trabajos. Del mismo modo en nuestro laboratorio hemos demostrado que la gzmA extracelular es capaz de inducir la producción de IL-1 α e IL-6 en macrófagos. Por otro lado, se han observado niveles elevados de gzmA en enfermedades inflamatorias crónicas y en procesos inflamatorios patológicos. En pacientes con artritis reumatoide se han encontrado niveles elevados de gzmA, tanto en plasma como en fluidos sinoviales (Tak et al., 1999). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la gzmA es capaz de inducir osteoclastogénesis a través de un mecanismo dependiente de TNF α , y utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), se observó que los ratones deficientes de gzmA mostraban una menor severidad de la enfermedad, menor daño a nivel histológico y respuesta inflamatoria disminuida en las articulaciones (Santiago et al., 2017). En esta misma línea, otro grupo de investigación, utilizando un modelo de artritis inducida por el virus Chikungunya, observó un incremento en la expresión de gzmA en articulaciones y ganglios linfáticos, demostrando de nuevo que los ratones deficientes en la proteasa presentaban un cuadro menos severo (Wilson et al., 2017). Asimismo, en pacientes con sepsis bacteriana se han encontrado niveles elevados de gzmA (Lauw et al., 2000), y en modelos de ratones deficientes en gzmA se ha comprobado que estos son más resistentes a la endotoxemia inducida por LPS (D. A. Anthony et al., 2010; Metkar et al., 2008).

Por último, en nuestro laboratorio se ha observado que, ratones deficientes en gzmA a los que se les indujo colitis (aguda y crónica) y cáncer colorrectal asociado a colitis, presentaban una mayor tasa de supervivencia, menor severidad en la enfermedad y una reducción en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Con este modelo de cáncer hemos demostrado que los ratones deficientes en gzmA presentan una menor incidencia y número de tumores, siendo estos tumores de menor diámetro al compararlos con los tumores desarrollados por ratones de fenotipo silvestre (wt). Estos datos indican que la inflamación crónica inducida por gzmA favorece la aparición de cáncer colorrectal.

Todas estas evidencias convierten a la gzmA en una diana terapéutica interesante para el tratamiento de enfermedades de origen inflamatorio. Es por ello que la búsqueda y el estudio de posibles inhibidores de esta proteasa es de gran interés, con el fin de utilizarlos como potenciales fármacos para el tratamiento de dichas patologías.

Inhibidores de gzms: familia de serpinas

Los CTL y células NK son resistentes a los efectos tóxicos de la de perf y de las gzms, aunque los mecanismos que garantizan su supervivencia una vez se produce la degranulación todavía no están bien definidos. Algunos de los factores que contribuyen a dicha resistencia son la proteína LAMP1, que protege de los efectos de la de perf sobre células NK (Cohnen et al., 2013) y la cathepsina B en los CTLs (Balaji, Schaschke, Machleidt, Catalfamo, & Henkart, 2002). Además, los CTL expresan niveles elevados de serpinB9, inhibidor natural de la gzmB, cuya presencia podría aportar resistencia adicional frente a la toxicidad de la de perf y las gzms (Bird et al., 1998).

Las serpinas son una amplia familia de inhibidores de proteasas, claves en la regulación de numerosas cascadas proteolíticas. Suelen dividirse en dos grupos: A, que incluye moléculas de respuesta inflamatoria, como la antitripsina y antiquimiotripsina; y el clado B, con moléculas de carácter inhibitorio que previenen la inapropiada actividad de proteasas citotóxicas (Law et al., 2006). Entre estas serpinas de tipo B se incluyen la serpinB9, inhibidor de gzmB humana; la serpinB6 (spi6), inhibidor de gzmB en ratón (Kaiserman et al., 2006b; Zhang et al., 2006) y serpinb6b (spb6b), un inhibidor específico de la gzmA en ratón (Kaiserman et al., 2014).

Búsqueda de nuevos inhibidores: Ensayos “High-Throughput Screening”

Uno de los procedimientos que se ha convertido en un método rutinario para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos son los ensayos “high-throughput screening” (HTS). La gran flexibilidad de estos ensayos permite testar cientos e incluso miles de compuestos en paralelo, de forma rápida y automatizada en la mayoría de casos, permitiendo identificar compuestos con una determinada característica química/biológica de interés, a un coste económico, material y de tiempo, mucho menor que con las técnicas de análisis tradicionales (Hertzberg & Pope, 2000; Mayr & Bojanic, 2009). Además, a diferencia de los primeros años en los que se daba mucho énfasis al aumento constante de la capacidad de detección (aumento cuantitativo) a través de la automatización y la miniaturización, en los últimos años la tendencia ha cambiado, centrándose más en el contenido y la calidad (aumento cualitativo) (Mayr & Bojanic, 2009).

Si bien las HTS se llevan aplicando en la industria farmacéutica desde su origen a mediados de los años 90, el desarrollo y progreso de la tecnología experimentado en la última década, ha fomentado que se empiecen a aplicar también en la propia investigación académica, siendo ya comunes en áreas muy diversas de la biología.

Con este planteamiento, proponemos la hipótesis de que la obtención de una molécula con capacidad inhibitoria de gzmA sería de gran utilidad para reducir su actividad pro-inflamatoria en enfermedades y patologías de tipo inflamatorio o autoinmune, utilizando para ello una librería de compuestos químicos para obtener e identificar los posibles inhibidores de gzmA.

3. Objetivos

El objetivo general del trabajo consiste en la identificación de inhibidores químicos capaces de bloquear la actividad pro-inflamatoria de la gzmA, realizando para ello un cribado en librerías de compuestos químicos.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Expresar y purificar el zimógeno inactivo de gzmA (progzmA) de ratón en *E. coli*
2. Generar la forma activa de la gzmA de ratón a partir la progzmA purificada
3. Comprobar la correcta activación de la gzmA a través de un ensayo de actividad enzimática.
4. Identificar posibles inhibidores de gzmA utilizando una librería de compuestos químicos.
5. Diferenciar macrófagos pro-inflamatorios de fenotipo M1 a partir de médula ósea de ratón.
6. Determinar si los compuestos que demostraron capacidad para inhibir la gzmA *in vitro*, bloquean la producción de IL-6 inducida por gzmA en macrófagos M1.

4. Materiales y métodos

4.1 Expresión y purificación de Granzima A recombinante de ratón en sistema de expresión *E. coli*.

4.1.1 Expresión de gzmA en *E.coli*

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó una cepa de *Escherichia coli* XL-blue transfectada con el plásmido pET-21a, que incluye el gen de la gzmA de ratón para su expresión inducible por IPTG (Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido, MP Biomedicals).

En primer lugar, se realizó un precultivo con 20 µl de bacterias en 10 ml medio LB-agar (Composición por litro: 5 g NaCl (Sigma), 10 g triptona (Sigma), 5 g Yeast Extract (Sigma)) con ampicilina 100 µl/ml (Panreac) incubando a 37 °C durante 12 h con agitación (190 rpm). Posteriormente, se realizó un segundo precultivo con 5 ml del primero en 50 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml. Se incubó overnight con las mismas condiciones de temperatura y agitación.

Al día siguiente, se añadieron 50 ml del precultivo en 500 ml de medio LB en enlarmeyer de 2 L, se ajustó la densidad óptica (DO)_{600nm} (Kontron) a 0,2 y se incubó a 37 °C con agitación (190-210 rpm). A partir de las 3 h de incubación se midió la DO_{600nm} hasta que esta se encontró entre 0,6-0,8, indicativo de que el cultivo ha entrado en fase de crecimiento exponencial.

En este momento se realizó la inducción con IPTG, a una concentración final de 1 mM. Se incubó durante 3 h a 37 °C con agitación (190-210 rpm). Previamente a la inducción con IPTG se reservó 1 ml de cultivo, que se tomó como referencia para ver la sobreexpresión de la proteína. Tras la inducción se tomó de nuevo 1 ml de cultivo para comprobar la sobreexpresión.

4.1.2 Purificación de gzmA

A continuación, el cultivo se centrifugó (Beckman Coulter Avanti J-E) a 6000 rpm durante 15 min, y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó con PBS (10-15 ml) y de nuevo se centrifugó en las mismas condiciones. El pellet se pasó a un falcon previamente pesado y se congeló a -20 °C hasta el día siguiente.

Al día siguiente se descongeló el pellet en hielo y se resuspendió en Tampón de lisis (TrisHCl 50 mM (MP Biomedicals), NaCl 100 mM, DNAsa 1 mg/ml (Sigma), Triton X 0,5 % (Sigma), inhibidor de proteasa 1 X (Roche), DTT 2 mM (Sigma) y lisozima 2 mg/ml (Sigma)) a razón de 1 ml por cada gramo de pellet obtenido y se dejó en la noria 2 h a 4 °C.

A continuación se lisaron las células mediante sonicación, pasando para ello la suspensión a un beaker en hielo. Se sonicó (Hielscher) a ¾ de amplitud y ¾ de pulso por 45 segundos, repitiendo 10 veces y reposando 2 min entre cada vez. Se tomó una alícuota tras el lisado y después se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se separó una alícuota para comprobar que no se perdía proteína.

Los cuerpos de inclusión, donde queda expresada la gzmA, se resuspendieron en el tampón de desnaturalización con cloruro de guanidinio (GuHCl Sigma) a razón de 3 ml/litro de cultivo, pasándolos repetidamente a través de una jeringuilla con aguja 18 G, y se dejó incubando overnight a temperatura ambiente. (Composición del tampón desnaturalización: GuHCl 6 M, TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 20 mM Panreac, DTT reducido 2 mM, DTT oxidado 10 mM, pH 8).

Al día siguiente se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 min a 4 °C para eliminar el material insoluble. El resto de sobrenadante se dializó overnight a temperatura ambiente, para eliminar el DTT y EDTA, en un litro de solución Tris-HCL 1 M, NaCl 500 mM, GuHCl 6 M a pH 5.

Posteriormente, el sobrenadante dializado se añadió sobre 100 vol de tampón de plegamiento (TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, arginina 0,5 M Sigma y glicerol 10 % Panreac) en agitación hasta que se mezcló bien, y se incubó durante 72 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 20.000 rpm 15 min 4 °C para eliminar el material insoluble. Se reservó una alícuota para comprobar presencia de la proteína, y se dializó el resto frente a 100 vol de MT PBS (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 16 mM (Panreac) y NaH₂PO₄ 4 mM (Panreac)), cambiando la diálisis cada 12 h durante 72 h. Transcurrida la diálisis, se centrifugo a 6000 rpm 15 min a 4 °C para eliminar el material insoluble y se filtró el sobrenadante con un filtro de membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0,45 µm seguido de otro de 0,22 µm.

A continuación se preparó la columna de intercambio catiónico de 5 ml HiTrap SP XL (GE Healthcare) para la purificación. Una vez se equilibró la columna, se ajustó el flujo para que pasara la muestra, trabajando en cámara fría. Posteriormente, se lavó la columna con 25 ml de MT PBS y se procedió a eluir la proteína utilizando un flujo creciente de NaCl, desde 150 mM de NaCl hasta 2 M de NaCl (las disoluciones fueron previamente degasificadas y filtradas por 0,45 µm y 0,22 µm). Tras finalizar el proceso, se regeneró la columna.

Una vez recogidas las fracciones, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % para determinar que fracciones contenían gzmA. También se determinó la concentración de proteína en dichas fracciones mediante la técnica de Bradford.

4.1.3 Activación de la gzmA

En primer lugar, las alícuotas que contenían gzmA se juntaron en un único vial, y se dializó durante 4 h con el tampón de actividad de la catepsina C (Sigma) (Tampón: MT PBS y Acetato de sodio NaAc 3 H₂O 75 mM (Panreac), a pH 5.5). Por otro lado, a la catepsina C (5 U/10mg de proteína), se le añadió DTT 2 mM y se incubó a 37 °C 30 min. Tras la activación, la catepsina C se dializó durante 4 h en MT PBS NaAc pH 5.5 para quitar el DTT. Se comprobó la actividad de la catepsina C realizando un ensayo colorimétrico con su sustrato específico (H-gly-phe-pNA (BACHEM)).

Una vez que la gzmA y la catepsina C se dializaron en MT PBS NaAc pH 5.5, se llevó a cabo la reacción de activación. Se incubaron overnight a temperatura ambiente. Al día siguiente se dializó frente a MT PBS pH 7.4 para inactivar la catepsina C y se realizó un ensayo de actividad de gzmA. La gzmA se alícuotó y guardó a -80 °C hasta posteriores ensayos.

4.1.4 Ensayo de actividad de gzmA

Para confirmar la correcta activación de la gzmA y determinar la mínima concentración con la que se obtiene una actividad enzimática adecuada, se llevó a cabo un ensayo de actividad en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Fisher), con un volumen final de 100 µl en cada pocillo.

- Se realizó una dilución seriada 1:2 de gzmA activa desde 600 nM hasta 37.5 nM en tampón de actividad de gzmA (TrisHCl 100 mM pH 8,5) y se añadió el sustrato a concentración final 300 nM (tripéptido con Paranitroanilina Bz-Pro-Phe-Arg-pNA HCl (BACHEM)).

- Blanco: solo tampón de actividad de gzmA
- Sustrato: sustrato de gzmA en tampón de actividad
- Control positivo: lisado de la línea celular 1,3E6SN (del inglés citotoxic t-lymphocyte line). 20.000 cél/pocillo equivalente a 900 ng de gzmA.
- Control negativo: gzmA inactiva

Se incubó en estufa a 37 °C y se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm y 490 nm a varios tiempos: 0, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, y 24 h en lector de placa Synergy™ HT, BioTek.

4.2 Cribado de posibles inhibidores de gzmA de ratón en librerías de compuestos químicos.

4.2.1 Librería “Approved Oncology Drugs Set VIII” (NCI)

Se realizó un ensayo de inhibición con los compuestos presentes en 2 placas pertenecientes a la librería “Approved Oncology Drugs Set VIII”: 4858 y 4859. Las placas originales, de 96 pocillos, presentaban los compuestos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración 10 mM en 20 µL. Todos los compuestos de esta librería son agentes y fármacos aprobados por la “Food and Drug Administration” (FDA) para el tratamiento del cáncer (“Available Plates | Drug Synthesis and Chemistry Branch (DSCB) | Developmental Therapeutics Program (DTP),” n.d.).

En primer lugar, se procedió a realizar una dilución intermedia 1:100, pasando 1 µl de cada compuesto a una placa de fondo redondo (Thermo Fisher), y completando con 99 µl de tampón de actividad de gzmA, manteniendo la misma distribución de los compuestos que en la placa original. De esta disolución intermedia se pasaron 10 µl a una nueva placa de fondo plano, donde se realizó el ensayo, siguiendo de nuevo la misma distribución. A cada pocillo se añadió gzmA disuelta en tampón de actividad a una concentración final de 300 nM.

La primera columna de la placa se reservó para los controles (las placas originales no presentan compuestos en la columna 1):

- gzmA por triplicado: 300 nM
- gzmA 300 nM con inhibidor específico de gzmA de ratón, spb6b (relación 1:8), purificada en el laboratorio, a concentración de 2,4 µM
- gzmA 300 nM con inhibidor dipéptido (Z-Phe-(4-AmPhe)p(OPh)2), sintetizado por el equipo de Carlos Cativiela, Dpto. Química Orgánica. 0,1 mM
- Controles negativos: sustrato a 300 nM y tampón de actividad de gzmA
- Control positivo: línea 1,3E6SN: 20.000 células, equivalen a 900 ng de gzmA.

Se incubó en estufa durante 45 min para permitir la inhibición y posteriormente se añadió sustrato a concentración final 300 nM (salvo en el blanco). El volumen final de cada pocillo fue 100 µl, quedando los compuestos a testar a una concentración final 10 µM.

Se incubó a 37 °C y se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm y 490 nm a varios tiempos: 0, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, y 24 h, en lector de placa Synergy™ HT, BioTek.

4.2.2 Librería “Mechanistic Set IV” (NCI)

Se realizaron ensayos de inhibición con los compuestos presentes en las placas 4847, 4848, 4849, 4850, 4851 de la librería “Mechanistic Set IV”. En este caso, los compuestos estaban disueltos en 20 µl de DMSO a una concentración de 1 mM. Los productos presentes en esta librería son una representación de un amplio rango de estructuras que muestran patrones de inhibición de crecimiento, basándose en los resultados de ensayos con más de 60 líneas celulares (“Available Plates | Drug Synthesis and Chemistry Branch (DSCB) | Developmental Therapeutics Program (DTP),” n.d.).

En estos ensayos no se realizaron diluciones intermedias ya que las placas originales presentaban una concentración 1 mM. Se tomó 1 µl de cada compuesto y se pasó directamente a una placa de fondo plano donde se realizó el ensayo, con un volumen final 100 µl, quedando los compuestos a concentración final 10 µM. El ensayo se realizó siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior.

4.3 Determinación de la capacidad de los compuestos seleccionados de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos estimulados con gzmA.

4.3.1 Diferenciación de Macrófagos (Mφ) pro-inflamatorios M1 derivados de médula ósea

Se utilizaron ratones de estirpe C57BL/6J sacrificados por dislocación, de los cuales se extrajeron las patas traseras, a nivel de la cadera. Trabajando de forma continua en esterilidad y con ayuda de tijeras y pinzas, se eliminó el tejido muscular para dejar el hueso lo más limpio posible. A continuación, se esterilizó en etanol 70 %, y posteriormente se lavó con medio RPMI (Sigma). Se cortaron los extremos del fémur y la tibia para poder visualizar la médula ósea, la cual se extrajo haciendo pasar repetidas veces con una jeringuilla volúmenes pequeños (1-2 ml) de medio RPMI a través de la cavidad de la médula.

Se obtuvo así la médula, que se transfirió a un falcon, pasando la suspensión celular por un filtro/tamiz de 40 µm (Cell Strainer Corning). Se centrifugó (Beckman Coulter Allegra X-15R) a 1500 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 900 µl de agua destilada, lo cual provocó la lisis de eritrocitos por choque osmótico, y se añadió de forma inmediata en 100 µl PBS 10 x para equilibrar la concentración y evitar la lisis de las demás células, completando además con medio RPMI. De nuevo se pasó filtrando a un nuevo falcon y se centrifugó a las mismas condiciones.

El pellet se resuspendió en 20 ml de medio adecuado para la diferenciación (medio condicionado de base RPMI 1640 con Glutamax (Sigma), suplementado con 10 % de SFB, 10 % de sobrenadante de la línea X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF). Se ajustó la concentración a 10^6 cél/ml, y se sembraron 2 placas de 90 mm con 10 ml cada una. Se incubaron en estufa a 37 °C 5 % CO₂. Se cambió el medio de cultivo al tercer día, sustituyéndolo por 10 ml de medio fresco. El séptimo día se eliminó el medio y se añadieron 3 ml de tripsina (Sigma) en cada placa, y se incubó durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, y con ayuda de una rasqueta de células (TPP) se terminaron de separar los Mφ adheridos a la placa. Posteriormente las células ya en suspensión se pasaron a un nuevo falcon y se añadieron 5 ml de medio de cultivo con SFB 10 % para diluir

e inactivar la tripsina. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de medio.

Se procedió a realizar un conteo para ajustar la densidad celular a 5×10^5 cél/ml y se sembraron placas de 96 pocillos para ensayos posteriores (ver 4.3.2).

4.3.2 Análisis de producción de IL6 por Mφ M1 en presencia de gzmA y frente a diversos inhibidores

Se realizaron dos ensayos por separado en los que se sembraron en placas de 96 pocillos 5×10^4 Mφ/pocillo (volumen final 100 µl). Se probaron un total de 8 condiciones por placa, cada una por triplicado, sembrando en total 24 pocillos/placa. Se dejó el cultivo 24 h en estufa a 37 °C 5 % CO₂. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se ensayaron las diferentes condiciones:

- Mφ en medio sin suero
- Mφ con GzmA de *E.coli* (a concentración final 300 nM)
- Mφ con GzmA de *E.coli* + spb6b (conc. final 2,4 µM, relación 8:1)
- Mφ con GzmA de *E.coli* + dipéptido (a concentración final 100 µM)
- Mφ con GzmA de *E.coli* + compuesto inhibidor a testar (a concentración final 10 µM)
- Mφ con spb6b (a concentración final 2,4 µM)
- Mφ con dipéptido (a concentración final 100 µM)
- Mφ con compuesto a testar, diferente en cada ensayo (a concentración final 10 µM)

Se dejó incubando en estufa durante 24 h. Transcurrido este tiempo se recogieron los sobrenadantes y se congelaron hasta su utilización para la cuantificación de citoquinas por ELISA (4.4.2)

4.4 Análisis de proteínas

4.4.1 Análisis de la sobreexpresión de gzmA mediante inmunodetección Western-Blot

Se realizó un Western-Blot para confirmar la sobreexpresión de gzmA de ratón en el sistema de expresión de *E.coli*. Se utilizaron como muestras las distintas alícuotas recogidas durante el protocolo de expresión y purificación (4.1).

En primer lugar se determinó la concentración de proteínas totales de cada alícuota mediante la técnica de Bradford, para asegurar cargar la misma cantidad de proteína de cada muestra en el gel de electroforesis.

Finalizada la electroforesis se procedió a realizar la transferencia a membrana de nitrocelulosa (BioRad), mediante una transferencia en sándwich en un equipo de transferencia semiseca (BioRad) a 20 V y 0,4 A durante 55 min, en tampón de transferencia (Trans-Blot Turbo Transfer Buffer BioRad). A continuación, se procedió al bloqueo de la membrana con disolución tampón de bloqueo SEA-BLOCK blocking buffer (Thermo Scientific) durante 1 h. Posteriormente se lavó tres veces con PBS-TWEN 0,1 % (TWEN 20 MP), con agitación durante 5 min cada vez.

Para la detección de gzmA se utilizó como anticuerpo primario anti-gzmA de ratón obtenido en rata (producido en el laboratorio), el cual se dejó incubando con la membrana durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se lavó de nuevo tres veces con las mismas condiciones de lavado mencionadas anteriormente. A continuación, se incubó con anticuerpo secundario anti-rata obtenido en cabra (IDRye 800CW, LI-COR) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el exceso de anticuerpo mediante tres lavados de 10 min en agitación con PBS-TWEEN 0,1 %.

La visualización se realizó en el equipo Odyssey Clx (LI-COR) mediante espectroscopía de infrarrojos cercano.

4.4.2 Cuantificación de IL-6 por ELISA

Se utilizó el kit “Ready-Set-Go” de Afftmetricx BioScience para cuantificar la producción de IL-6 en Mφ estimulados con gzmA en presencia de diversos inhibidores.

Se emplearon placas de 96 pocillos para ELISA (NUNC Maxisorp), donde se dispusieron 100 µl por pocillo de anticuerpo de captura a la concentración recomendada en “Coating buffer” incubando toda la noche a 4 °C. Se lavó la placa tres veces con 200 µl PBS-TWEEN 20 0,05 % y se bloquearon las uniones inespecíficas con 200 µl de Tampón de ensayo 1 x durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron las muestras de sobrenadante de Mφ diluidas en Tampón de ensayo (1:20) y el estándar o patrón como recomienda el fabricante, y se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces con 100 µl de PBS-TWEEN 20 0,05 % y se procedió a añadir el anticuerpo de detección (conjugado con biotina) a la concentración recomendada, incubando durante 1 h. Tras lavar 5 veces con PBS-TWEEN 20 0,05 % se añadieron 100 µl de avidin-HRP (“horseradish peroxidase”) diluido en Tampón de ensayo 1 x, como indica el protocolo y se incubó durante 30 min. Tras lavar 7 veces se adicionaron 100 µl de sustrato TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina), el cual se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente hasta detener la reacción con 50 µl de solución H₂SO₄ 2 N a los 15 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm y 570 nm.

5. Resultados y discusión

5.1 Expresión y purificación de gzmA recombinante de ratón en *E. coli*

Tras llevar a cabo el protocolo de expresión y purificación de gzmA en *E. coli*, se procedió a comprobar la presencia de gzmA en las diferentes alícuotas recogidas a lo largo del mismo, para determinar la pureza y eficiencia del proceso y comprobar además la sobreexpresión de gzmA tras la adición del inductor IPTG.

5.1.1 Análisis de la sobreexpresión de gzmA

Se realizó una electroforesis con las alícuotas recogidas a lo largo de todo el protocolo:

- T=0: alícuotas de dos cultivos (1 y 2) previo a la adición de IPTG
- T=f: alícuotas de dos cultivos (1 y 2) tras la inducción con IPTG.
- L: alícuota del lisado celular
- S: alícuota de sobrenadante del lisado, obtenida tras centrifugar el lisado.
- R: alícuota tras el refolding de la proteína.

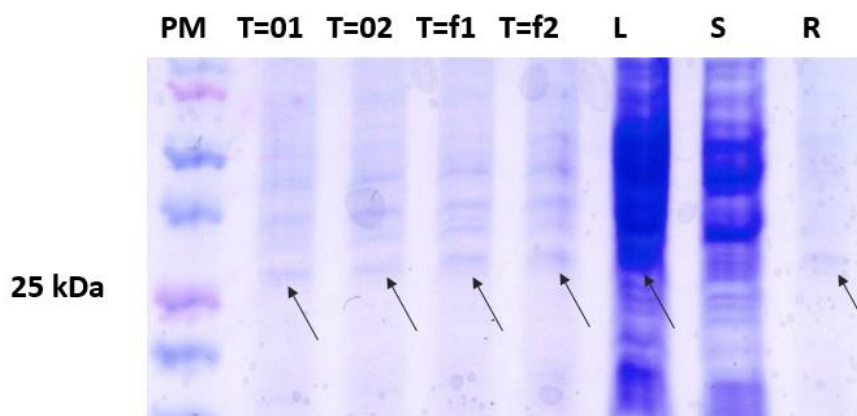


Figura 5.1. Sobreexpresión de gzmA de ratón en cuerpos de inclusión de *E. coli*. Se realizó con las alícuotas: T=01: cultivo 1 previo a la inducción de IPTG; T=02: cultivo 2 previo a la inducción de IPTG; T=f1: cultivo 1 tras la inducción IPTG, T=f2: cultivo 2 tras la inducción de IPTG; L: lisado, S: sobrenadante del lisado; R: refolding, PM: marcador de peso molecular. La marca de 25kDa y las flechas sitúan la posición de las bandas correspondientes a la gzmA.

Observando las bandas correspondientes entorno a 25 kDa (peso molecular de la gzmA), podemos comprobar la presencia de gzmA antes de la inducción ($t=0$), lo cual nos podría indicar que la gzmA se expresa de forma constitutiva en esta cepa de *E.coli* sin necesidad previa de inducción por IPTG. Sin embargo tras la inducción ($t=f$), las bandas aumentan de intensidad, revelando que se produce, en efecto, un aumento de expresión de gzmA gracias a la adición de IPTG, es decir, hay sobreexpresión. Si bien en esta imagen el aumento es discreto, se cuantificó por densitometría las diferencias entre ambos tiempos para confirmar la sobreexpresión, realizando para ello un gel en paralelo (ver 5.1.4).

La gzmA aparece presente también en la alícuota de lisado L, junto a una gran cantidad de otras proteínas procedentes del cultivo. En la alícuota S (sobrenadante) la banda de gzmA no está presente, lo cual indica que no perdemos gzmA en el sobrenadante del lisado, ya que ésta se expresa en cuerpos de inclusión.

Por último, en el carril R (refolding), aparece de nuevo la banda de gzmA, aunque sin embargo, casi no se distingue en la imagen debido a que la gzmA está muy diluida. No obstante se confirmó la presencia de gzmA en la alícuota de refolding mediante la identificación por western-blot (ver 5.1.5). Además hay que mencionar que durante el proceso de refolding, gran parte de la proteína precipita y se pierde, siendo este quizá el paso que podríamos considerar como limitante del proceso.

5.1.2 Determinación de fracciones eluidas que contienen gzmA

Tras la purificación en columna, tal y como establecía el protocolo, se realizó una electroforesis con las fracciones recogidas durante la elución, para determinar las fracciones que contenían gzmA. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con posterior tinción de azul de coomassie.

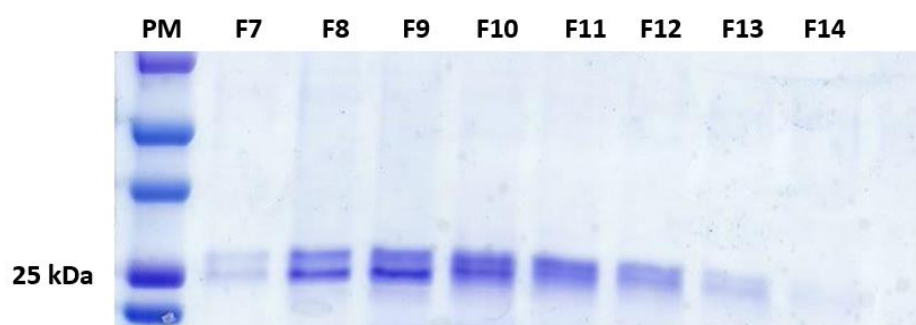


Figura 5.2. Purificación de gzmA mediante cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por SDS – PAGE. Fracciones F: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y PM: marcador de peso molecular. La marca de 25 kDa sitúa la posición de las bandas correspondientes a la gzmA.

Como se muestra en la figura se obtuvieron bandas correspondientes al peso molecular de la gzmA (25 kDa) y con pureza adecuada en varias fracciones. Sin embargo se puede observar que parte de la proteína se degrada durante el proceso, si bien todavía no se ha logrado identificar las etapas o pasos críticos que conducen a esta degradación. Concluimos que no se trata de impurezas u otras inespecificidades, ya que esas bandas también se detectan en la técnica de Western-Blott (ver sección 5.1.5)

Una vez determinadas las fracciones que contenían gzmA, en este caso las fracciones 8, 9, 10, 11 y 12, se juntaron en una única alícuota para proseguir el protocolo de activación.

5.1.3 Ensayo de actividad de gzmA

Se realizó un ensayo para confirmar la activación de la gzmA y poder determinar la mínima concentración que presenta una actividad enzimática adecuada, como recoge el protocolo (4.1.4). Los resultados se muestran en la figura a continuación:

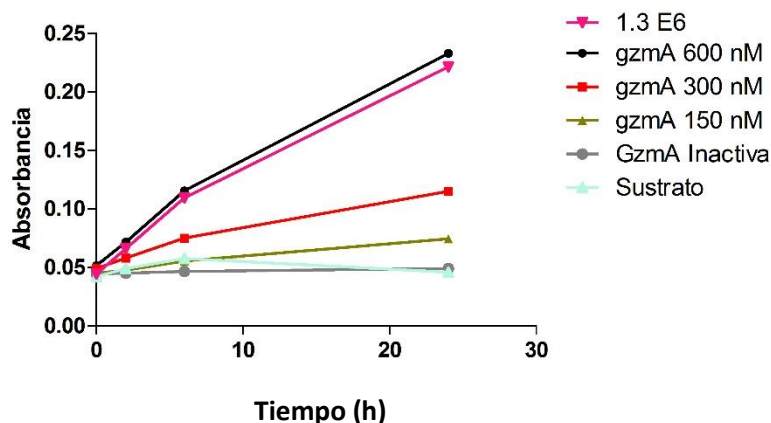


Figura 5.3. Ensayo de actividad gzmA. Se realizó un ensayo de actividad tal y como se describe en la sección 4.1.4. La gráfica representa los valores de absorbancia (405 nm-490 nm) a tiempo 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, para las distintas concentraciones de gzmA testadas (600 nM, 300 nM, 150 nM), gzmA inactiva, control positivo (línea celular 1,3E6SN) y sustrato.

Como podemos observar en la figura 5.3, se confirma la correcta activación de la gzmA, ya que los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las concentraciones, son siempre más elevados que en el caso de la gzmA inactiva, quien mostró una absorbancia basal igual al sustrato. El control de sustrato se utilizó para asegurar que este no se degrada de forma espontánea, de forma que el aumento de absorbancia (producido por la escisión de la pNA del sustrato) es debido únicamente a la propia actividad de la enzima.

Se consideró como actividad enzimática adecuada aquella que a tiempo 24 h, mostraba una absorbancia superior a 0,1. En este caso, la concentración mínima de gzmA que alcanzó dicho valor fue 300 nM, siendo esta la que elegimos para realizar los ensayos posteriores.

5.1.4 Cuantificación de la sobreexpresión por densitometría

Se cuantificó la sobreexpresión de gzmA realizando un gel en paralelo con las muestras T=0 (cultivos 1 y 2) y T=f (cultivos 1 y 2). Se determinó por densitometría el área bajo la curva correspondiente a cada una de las bandas de gzmA, normalizando frente al contenido de proteínas totales; y se cuantificó el incremento de expresión de gzmA tras la adición de IPTG. El resultado se recoge a continuación en la Tabla 5.1.

Alícuota	Área banda GzmA	
t=01	17,733,146	Relación t=f1/t=01: 1.324
t=02	23,704,459	
t=f1	23,478,702	Relación t=f2/t=02: 1.519
t=f2	36,010,702	

Tabla 5.1. Área bajo la curva, Densitometría. Alícuotas: t=01 (cultivo 1 antes de inducción por IPTG), t=02 (cultivo 2 antes de inducción por IPTG), t=f1 (cultivo 1 tras inducción por IPTG) y t=f2 (cultivo 2 tras inducción por IPTG).

Confirmamos así que la inducción con IPTG lleva a la sobreexpresión de *gzmA* en el sistema de *E.coli*, si bien los valores en este caso concreto no son muy elevados, ya que en este experimento solo se aumentó la expresión 1,3 - 1,5 veces.

5.1.5 Identificación de *gzmA* mediante técnica Western-Blott

Por otro lado, se llevó a cabo la detección de *gzmA* mediante inmunotransferencia o western-blott, para comprobar que, efectivamente, se trataba de *gzmA*, utilizando para ello anticuerpos específicos.

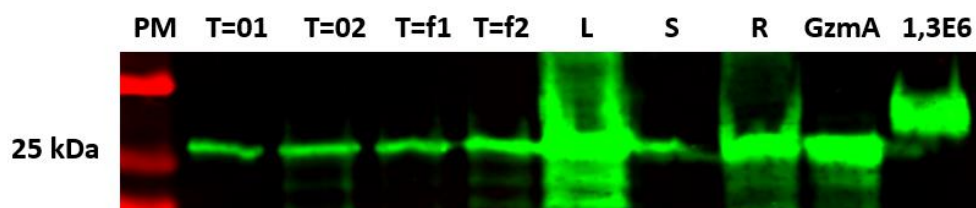


Figura 5.4. Detección de *gzmA* mediante técnica Western-Blot. Se realizó con las alícuotas: T=01: cultivo 1 previo a la inducción con IPTG; T=02: cultivo 2 previo a la inducción con IPTG; T=f1: cultivo 1 tras la inducción con IPTG, T=f2: cultivo 2 tras la inducción con IPTG; L: lisado de pellet de *E.coli*, S: sobrenadante del lisado; R: refolding; GzmA: *gzmA* purificada; 1,3E6: lisado celular de la línea 1,3E6SN (control positivo). PM: marcador de peso molecular. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-*gzmA* de ratón obtenido en rata (producido en el laboratorio) como anticuerpo primario y anti-rata obtenido en cabra (IDRye 800CW, LI-COR) como secundario (ver 4.4.1). La marca de 25 kDa sitúa la posición de las bandas correspondientes a la *gzmA*.

En primer lugar se observa presencia de *gzmA* a T=0, lo cual confirma que *E.coli* es capaz de expresar la *gzmA* codificada en el plásmido de forma basal, de forma previa a la inducción con IPTG. No obstante, la intensidad de la banda aumenta de nuevo a T=f, debido a la sobreexpresión.

De nuevo en el carril L lisado aparece una banda intensa a 25 kDa. En este caso, aparece una pequeña banda de *gzmA* en el sobrenadante S, lo cual quizá se deba a una pequeña cantidad de *gzmA* que pudiera haber quedado en él, y que no se observa en el gel mostrado anteriormente (fig 5.1), ya que la tinción con azul de coomassie es mucho menos sensible; o bien a una pequeña extravasación desde el carril de lisado, siendo este caso lo más probable.

Los carriles correspondientes a la alícuota de refolding R y el de *gzmA* purificada, muestran una banda intensa correspondiente a la proteína. Por último, el carril 1,3E6SN como control positivo refleja que los anticuerpos funcionaron correctamente. Esta banda queda ligeramente retardada en el gel al tratarse de la proteína nativa, de mayor peso molecular.

Además de la banda característica de 25 kDa, los anticuerpos marcaron proteína en otros niveles, lo cual es posiblemente debido a la degradación de la *gzmA* que se produce durante los distintos pasos del proceso.

5.2 Cribado de librerías de compuestos químicos para identificación de posibles inhibidores de gzmA de ratón

Fueron analizados un total de 533 compuestos, de los cuales 133 pertenecían a la librería “Approved Oncology Drugs Set VIII” y 400 a la librería “Mechanistic Set IV”

Con las medidas de absorbancia tomadas en los ensayos de inhibición (ver 4.2) se procedió a analizar los datos para determinar la capacidad inhibitoria sobre gzmA de los diferentes compuestos.

Para ello, se restaron los valores de absorbancia a 405 nm menos los valores obtenidos a 490 nm. Esta diferencia se calculó para todos los tiempos (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h) y para cada compuesto. A continuación, se restó la diferencia obtenida a tiempo 0 h, calculando de este modo el incremento de absorbancia con respecto al tiempo inicial.

Por otro lado, se determinó el incremento de absorbancia promedio de gzmA (sin inhibidores controles ni compuestos a testar), valor que se estableció como 100 % de actividad. El incremento de absorbancia de cada compuesto se comparó con el de gzmA, determinando así el % de actividad de los compuestos con respecto a la gzmA.

Aquellos compuestos que presentaron una actividad menor al 60 % con respecto a la gzmA control, es decir, que presentaron al menos un 40 % de inhibición fueron seleccionados para la realización de ensayos posteriores de confirmación, dada su potencial acción como inhibidores de gzmA.

5.2.1 Resultados ensayos de confirmación

El objetivo de estos ensayos fue confirmar que los compuestos seleccionados realmente producían inhibición y que no se trataba de un falso positivo debido a algún error experimental; como pipeteo incorrecto, o por algún otro factor que pudiera haber alterado el primer ensayo realizado.

En estos ensayos se emplearon diferentes concentraciones de los compuestos testados, en dilución seriada 1:2 desde 20 μ M hasta 2,5 μ M. Se realizaron con las mismas cantidades y concentraciones de gzmA, sustrato y controles que los ensayos de inhibición descritos en la sección correspondiente de Materiales y Métodos (ver 4.2).

En el caso de la librería “Approved Oncology Drugs Set VIII” se encontró un único compuesto con las características de inhibición adecuadas:

- Placa 4859: compuesto 761431. Siguiendo el catálogo de identificación del NCI, dicho compuesto se corresponde con Vemurafenib / Zelboraf, acotado también como PLX4032 / RG7204. Este es un medicamento aprobado en monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos con melanoma no resecable o metastásico con mutación BRAF V600 positiva (CHMP, n.d.)

En el caso de la librería “Mechanistic Set IV”, se encontró un único compuesto que superaba el umbral de inhibición del 40%:

- Placa 4851: compuesto 622690. Este compuesto no tiene un nombre registrado, pero se trata de (5E)-5-(2,5-dimethylpyrrol-3-ylidene)-N,N-dimethyl-1,2,4-dithiazol-3-amine;perchloric acid (IUPAC)

Nota: La estructura química de estos compuestos, así como información adicional, se incluye en la sección de Anexos 8.2 *Estructura química de los compuestos con capacidad de inhibición de gzmA*.

Ambos compuestos fueron seleccionados para la realización de posteriores ensayos de confirmación. Sin embargo, los resultados de estos, mostraron que ninguno de los dos compuestos identificados presentaban inhibición adecuada de gzmA, a diferencia de lo obtenido anteriormente.

Es necesario mencionar que los ensayos HTS están sujetos a varias limitaciones que pueden conducir tanto a falsos positivos como falsos negativos (Bibette, 2012). La posición que ocupan los compuestos en las placas, la elección del umbral o “threshold”, la falta de réplicas y la escasez de métodos estadísticos robustos dificulta la obtención de resultados consistentes y fiables (Inglese, Shamu, & Guy, 2007; Malo, Hanley, Cerquozzi, Pelletier, & Nadon, 2006). Además en las librerías de “screening” de moléculas pequeñas (<1000Da) se suelen suceder comportamientos anómalos de ciertas moléculas, resultado de sus propiedades fisicoquímicas en lugar de su propia actividad biológica (Lipinski & Hopkins, 2004).

En primer lugar, los ensayos iniciales se realizan generalmente a una única concentración, lo cual ignora el factor de relación dosis-respuesta, dando lugar a múltiples falsos negativos/positivos. Por otro lado, todos los compuestos de una misma librería suelen disponerse en las placas de forma que son todos distribuidos y almacenados bajo unas mismas condiciones. Sin embargo, no todos los compuestos poseen las mismas propiedades fisicoquímicas, ni la misma estabilidad estructural. Es posible que debido a los procesos de congelación/descongelación o por acción del propio solvente, ciertos compuestos pierdan actividad con el tiempo, se degraden, se oxiden, formen agregados o incluso precipitados que no se vuelven a resuspender, conduciendo así a resultados dispares y falta de reproducibilidad en los mismos.

Esto podría explicar el hecho de que los compuestos que en principio presentaban inhibición de gzmA en un primer ensayo, no mostraran ese comportamiento de nuevo en los ensayos de confirmación.

No obstante, en la misma placa 4851 se había encontrado un compuesto con inhibición aproximada del 20 %. Si bien por este criterio, lo descartamos en un principio al estar por debajo del umbral (40 %), a la vista de los resultados obtenidos, decidimos realizar un ensayo de confirmación con el mismo. Los resultados mostraron una inhibición de gzmA aproximada del 35 %-40 % para todas las diluciones probadas, por lo que lo tomamos como un posible inhibidor. Este compuesto con identificador 382766, se corresponde con ((E)-5-(Diethylamino)-4,4-dimethyl-1-(4-methylphenyl)pent-1-en-3-one hydrobromide).

Finalmente, comprobamos la influencia de algunos de estos compuestos sobre la producción de IL-6 en Mφ estimulados con gzmA. Utilizamos este último compuesto, el 382766, como un posible inhibidor. Además también probamos el compuesto 761431 (vemurafenib), por su relevancia como fármaco de uso aprobado, aunque el ensayo de confirmación fue negativo.

5.3 Análisis de producción de IL-6 por Mφ M1 en presencia de gzmA y de gzmA con diversos inhibidores

Se realizaron dos ensayos en los que se estimularon Mφ con fenotipo M1, utilizando condiciones distintas, variando el compuesto inhibitorio a testar en cada uno de estos ensayos. Una vez realizada la estimulación durante 24 h, se llevó a cabo un ELISA para determinar la producción de IL-6, tal como se recoge en las secciones 4.3.2 y 4.4.2. Los resultados se muestran en las gráficas siguientes:

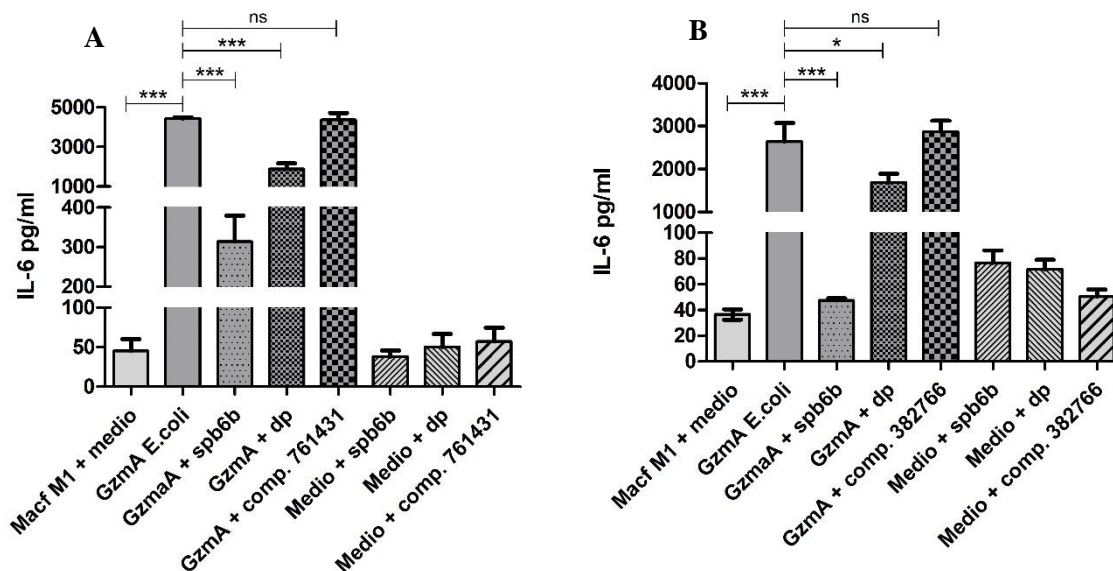


Figura 5.5 (A y B). Cuantificación IL-6 por ELISA. Se estimularon Mφ M1 con distintas condiciones: gzmA de ratón activa purificada a partir de *E.coli* (300 nm), gzmA purificada en *E.coli* (300 nm) preincubada con diversos inhibidores (spb6b 2,4 μM, dipéptido 100 μM), y compuestos a testar de la librería de compuestos: 761431 y 382766 (A y B, respectivamente) a 10 μM). Se usaron como controles medio con los inhibidores a las mismas concentraciones. Se incubaron durante 24 h y se recogió el sobrenadante para determinar los niveles de IL-6 por ELISA. Los valores se representan como la media ±SEM, cada uno por triplicado. La diferencia de las medias se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía con un análisis posterior de Bonferroni. Nivel de significación estadística (*, p<0,05; ***, p<0,001).

En el caso de los Mφ sin estimular (únicamente con medio sin suero) la producción de IL-6 es muy baja, como era de esperar. Sin embargo, los Mφ estimulados con gzmA de *E.coli* presentan una elevada producción de dicha citoquina.

Al testar gzmA de *E.coli* con los inhibidores spb6b y dipéptido se muestra una clara disminución en la producción de IL-6. En el caso de spb6b se produce una disminución aproximada del 90-95 % y en el caso del dipéptido de casi un 50 %, para ambos ensayos.

Los controles de Mφ con los inhibidores, pero sin gzmA, permiten comprobar que la producción de IL-6 es debida únicamente a la presencia de la proteasa. En todos estos casos los valores de IL-6 son mínimos (como sucedía en Mφ sin estimular únicamente con medio), indicando que los inhibidores no potencian la producción de la citoquina.

En el caso del compuesto 761431 (Vemurafenib), los valores obtenidos de IL-6 son similares a los producidos en la muestra de Mφ estimulados con gzmA. Esto nos confirma que este compuesto no es capaz de inhibir a la gzmA como ya habíamos comprobado previamente en el ensayo de confirmación (5.2.1).

Sin embargo, sucede lo mismo en el caso del compuesto 382766, donde la producción de la citoquina es de nuevo similar a la producida en presencia de gzmA, a pesar de que previamente presentaba capacidad inhibitoria según los ensayos anteriores. Una vez más podría deberse a factores como pérdida de actividad, inestabilidad estructural, problemas de solubilidad, oxidación...que pudieran afectar a los compuestos, como ya hemos mencionado previamente.

En cualquiera de los casos, la búsqueda e identificación de compuestos con capacidad inhibitoria de la proteasa gzmA es de gran interés, debido especialmente a su eminente papel proinflamatorio y su asociación a diversas enfermedades y patologías como hemos comentado previamente en el tabajo. Por ello podemos concluir, en vista de los resultados obtenidos, que este estudio debería de ser continuado en un futuro, dada su gran aplicación en el ámbito clínico.

6. Conclusiones

A raíz de los resultados obtenidos en el trabajo, podemos concluir que:

1. Utilizando un sistema de expresión basado en la cepa de *E. coli XL-blue* transfectada con el plásmido pET-21a, se logra la expresión de gzmA recombinante de ratón de forma inducible por IPTG.
2. La cathepsina C permite la correcta activación de la gzmA recombinante purificada.
3. La gzmA estimula la producción de IL-6 en Mφ sin necesidad de estímulos previos, lo cual sigue la línea de otros trabajos del grupo.
4. Los inhibidores spb6b y dipéptido inhiben la actividad enzimática de la gzmA, así como su actividad inflamatoria en Mφ al reducir los niveles de expresión de IL-6
5. El compuesto 382766, aunque capaz de inhibir la actividad con sustrato, no reduce la actividad inflamatoria en Mφ, al no observarse reducción en la expresión de IL-6.
6. El cribado de compuestos está condicionado por la propia naturaleza y limitaciones de los ensayos HTS
7. Se necesita proseguir con la investigación de inhibidores de gzmA, debido a su interés farmacológico.

Conclusions

Bearing the results obtained in this project, we can state that:

1. The expression of mouse recombinant gzmA is possible with an *Escherichia coli XL-blue* strain transfected with the pET-21a plasmid, being it inducible by IPTG.
2. Cathepsin C protease permits the correct activation of the purified recombinant gzmA
3. gzmA stimulates production of IL-6 in macrophages without need of previous stimulus, being it accorded with other group's reports.
4. Spb6b and dipeptide inhibit the enzymatic activity of gzmA and its inflammatory capacity, by reducing the IL-6 expression on Mφ.
5. Compound 382766, although inhibits the enzymatic activity of gzmA, fails to reduce its inflammatory activity, as reduction of IL-6 expression of Mφ couldn't be observed.
6. Compound screening is conditioned by the nature and limitations of the HTS assays.
7. There is need to continue the investigations regarding gzmA inhibitors due to their pharmacological interest.

7. Bibliografía

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). B Cells and Antibodies. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
- Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., & Eisenberg, D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 325(2), 355–365. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488100>
- Anderson, P., Caligiuri, M., O'Brien, C., Manley, T., Ritz, J., & Schlossman, S. F. (1990). Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(6).
- Anthony, D. A., Andrews, D. M., Chow, M., Watt, S. V., House, C., Akira, S., ... Smyth, M. J. (2010). A Role for Granzyme M in TLR4-Driven Inflammation and Endotoxemia. *The Journal of Immunology*, 185(3), 1794–1803. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000430>
- Anthony, D. A., Andrews, D. M., Watt, S. V., Trapani, J. A., Smyth, M. J., & Smyth, M. J. (2010). Functional dissection of the granzyme family cell death and inflammation, 235, 73–92.
- Arias, M., Martínez-Lostao, L., Santiago, L., Ferrandez, A., Granville, D. J., & Pardo, J. (2017). The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends in Cancer*, 3(6), 407–422. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.001>
- Available Plates | Drug Synthesis and Chemistry Branch (DSCB) | Developmental Therapeutics Program (DTP). (n.d.). Retrieved June 1, 2019, from https://dtp.cancer.gov/organization/dscb/obtaining/available_plates.htm
- Bakker, A. B. ., Wu, J., Phillips, J. H., & Lanier, L. L. (2000). NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Human Immunology*, 61(1), 18–27. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(99\)00160-3](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(99)00160-3)
- Balaji, K. N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., & Henkart, P. A. (2002). Surface Cathepsin B Protects Cytotoxic Lymphocytes from Self-destruction after Degranulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), 493–503. <https://doi.org/10.1084/jem.20011836>
- Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K. A., Clarke, C. J. P., ... Trapani, J. A. (2009). The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity*, 30(5), 684–695. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.016>
- Bibette, J. (2012). Gaining confidence in high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3), 649–650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119350109>
- Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., ... Bird, P. I. (1998). Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6387–6398. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6387>
- CHMP. (n.d.). ANEXO I FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zelborafepar-product-information_es.pdf
- Chowdhury, D., Beresford, P. J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.-S., Demple, B., ... Lieberman, J. (2006). The Exonuclease TREX1 Is in the SET Complex and Acts in Concert with NM23-H1 to Degrade DNA during Granzyme A-Mediated Cell Death. *Molecular Cell*, 23(1), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.005>

- Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., ... Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, 122(8), 1411–1418. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441832>
- Dourmashkin, R. R., Deteix, P., Simone, C. B., & Henkart, P. (1980). Electron microscopic demonstration of lesions in target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clinical and Experimental Immunology*, 42(3), 554–560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7214742>
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., & Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 112(5), 659–672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628186>
- Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., ... Dustin, M. L. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual Review of Immunology*, 28, 79–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101308>
- Griffiths, G. M., & Isaaz, S. (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *The Journal of Cell Biology*, 120(4), 885–896. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.4.885>
- Grossman, W. J., Revell, P. A., Lu, Z. H., Johnson, H., Bredemeyer, A. J., & Ley, T. J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Current Opinion in Immunology*, 15(5), 544–552. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00099-2)
- Hayes, M. P., Berrebi, G. A., & Henkart, P. A. (1989). Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(3), 933–946. <https://doi.org/10.1084/jem.170.3.933>
- Hertzberg, R. P., & Pope, A. J. (2000). High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(4), 445–451. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00110-1)
- Hiebert, P. R., Wu, D., & Granville, D. J. (2013). Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice. *Cell Death & Differentiation*, 20(10), 1404–1414. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.96>
- Inglese, J., Shamu, C. E., & Guy, R. K. (2007). Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries, 3(8), 438–441.
- Joeckel, L. T., & Bird, P. I. (2014). Are all granzymes cytotoxic in vivo? *Biological Chemistry*, 395(2), 181–202. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0238>
- Kaiserman, D., Bird, C. H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J. C., ... Bird, P. I. (2006a). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of Cell Biology*, 175(4), 619–630. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606073>
- Kaiserman, D., Bird, C. H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J. C., ... Bird, P. I. (2006b). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of Cell Biology*, 175(4), 619–630. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606073>
- Kaiserman, D., Stewart, S. E., Plasman, K., Gevaert, K., Damme, P. Van, & Bird, P. I. (2014). Identification of Serpinb6b as a species-specific mouse granzyme A inhibitor suggests functional divergence between human and mouse granzyme A. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525808>
- Kummer, J. A., Kamp, A. M., Citarella, F., Horrevoets, A. J., & Hack, C. E. (1996). Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9281–9286. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.16.9281>
- Lauw, F. N., Simpson, A. J. H., Hack, C. E., Prins, J. M., Wolbink, A. M., van Deventer, S. J. H., ... van der Poll, T. (2000). Soluble Granzymes Are Released during Human Endotoxemia and in Patients with Severe Infection Due to Gram-Negative Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(1), 206–213. <https://doi.org/10.1086/315642>

- Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., ... Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7(5), 216. <https://doi.org/10.1186/GB-2006-7-5-216>
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 3(5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nri1083>
- Lipinski, C., & Hopkins, A. (2004). Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, 432(7019), 855–861. <https://doi.org/10.1038/nature03193>
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H. P., ... Voskoboinik, I. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), 2659–2668. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>
- Lucken-Ardjomande, S., & Martinou, J.-C. (2008). Granzyme a, a stealth killer in the mitochondrion. *Cell*, 133(4), 568–570. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.031>
- Malo, N., Hanley, J. A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., & Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nature Biotechnology*, 24(2), 167–175. <https://doi.org/10.1038/nbt1186>
- Martinez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5047–5056. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R., & Lieberman, J. (2008). Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*, 133(4), 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.032>
- Masson, D., & Tschopp, J. (1985). Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(16), 9069–9072. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3874868>
- Masson, D., & Tschopp, J. (1987). A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell*, 49(5), 679–685. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90544-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90544-7)
- Mayr, L. M., & Bojanic, D. (2009). Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.004>
- Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., ... Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 211(1), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x>
- Metkar, S. S., Menaa, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., ... Froelich, C. J. (2008). Human and Mouse Granzyme A Induce a Proinflammatory Cytokine Response. *Immunity*, 29(5), 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.014>
- Metkar, S. S., Wang, B., Ebbs, M. L., Kim, J. H., Lee, Y. J., Raja, S. M., & Froelich, C. J. (2003). Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 160(6), 875–885. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210158>
- Page, L. J., Darmon, A. J., Uellner, R., & Griffiths, G. M. (1998). L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1401(2), 146–156. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(97\)00138-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(97)00138-9)
- Pardo, J., Aguilo, J. I., Anel, A., Martin, P., Joeckel, L., Borner, C., ... Simon, M. M. (2009). The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and Infection*, 11(4), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.02.004>
- Pardo, J., Wallich, R., Martin, P., Urban, C., Rongvaux, A., Flavell, R. A., ... Simon, M. M. (2008). Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death & Differentiation*, 15(3), 567–579. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402289>
- Peña, S. V., Hanson, D. A., Carr, B. A., Goralski, T. J., & Krensky, A. M. (1997). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(6), 2680–2688. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058801>

- Ritter, A. T., Angus, K. L., & Griffiths, G. M. (2013). The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunological Reviews*, 256(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/imr.12117>
- Romero, V., & Andrade, F. (2008). Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens*, 71(5), 409–416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01013.x>
- Santiago, L., Mena, C., Arias, M., Martin, P., Jaime-Sánchez, P., Metkar, S., ... Froelich, C. J. (2017). Granzyme A Contributes to Inflammatory Arthritis in Mice Through Stimulation of Osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatology*, 69(2), 320–334. <https://doi.org/10.1002/art.39857>
- Shi, L., Kam, C. M., Powers, J. C., Aebersold, R., & Greenberg, A. H. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(6), 1521–1529. <https://doi.org/10.1084/jem.176.6.1521>
- Shi, L., Kraut, R. P., Aebersold, R., & Greenberg, A. H. (1992). A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 175(2), 553–566. <https://doi.org/10.1084/jem.175.2.553>
- Sower, L. E., Klimpel, G. R., Hanna, W., & Froelich, C. J. (1996). Extracellular Activities of Human Granzymes. *Cellular Immunology*, 171(1), 159–163. <https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0187>
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., ... Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5386), 121–125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756476>
- Tak, P. P., Spaeny-Dekking, L., Kraan, M. C., Breedveld, F. C., Froelich, C. J., & Hack, C. E. (1999). The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clinical and Experimental Immunology*, 116(2), 366–370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10337032>
- Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology*, 2(12), REVIEWS3014. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790262>
- Tschopp, J., Masson, D., & Stanley, K. K. (1986). Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature*, 322(6082), 831–834. <https://doi.org/10.1038/322831a0>
- van Eck, J. A., Shan, L., Meeldijk, J., Hack, C. E., & Bovenschen, N. (2017). A novel proinflammatory role for granzyme A. *Cell Death & Disease*, 8(2), e2630. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.56>
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 388–400. <https://doi.org/10.1038/nri3839>
- Wensink, A. C., Hack, C. E., & Bovenschen, N. (2015). Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(2), 491–497. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.1401214>
- Wilson, J. A. C., Prow, N. A., Schroder, W. A., Ellis, J. J., Cumming, H. E., Gearing, L. J., ... Suhrbier, A. (2017). RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLOS Pathogens*, 13(2), e1006155. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006155>
- Young, J., Cohn, Z., & Podack, E. (1986). The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science*, 233(4760), 184–190. <https://doi.org/10.1126/science.2425429>
- Young, J. D., & Cohn, Z. A. (1986). Cell-mediated killing: a common mechanism? *Cell*, 46(5), 641–642. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3488814>
- Zhang, M., Park, S.-M., Wang, Y., Shah, R., Liu, N., Murmann, A. E., ... Ashton-Rickardt, P. G. (2006). Serine Protease Inhibitor 6 Protects Cytotoxic T Cells from Self-Inflicted Injury by Ensuring the Integrity of Cytotoxic Granules. *Immunity*, 24(4), 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.002>

8. Anexos

8.1 Abreviaturas

ADCC:	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, del inglés “antibody-dependent cellular cytotoxicity”.
APC:	Célula Presentadora de Antígeno.
CIA:	Artritis inducida por colágeno.
CTL:	Linfocito T citotóxico, del inglés “Cytotoxic T lymphocyte”.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico .
DO:	Densidad óptica.
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
FasL:	Ligando de Fas.
FDA:	“Food and Drug Administration”.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos.
gzm:	Granzima.
HTS	“High Throughput Screening”.
IL:	Interleuquina.
ILR:	Receptor de interleuquina.
IPTG:	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido.
LAMP1:	“Lysosomal-associated membrane protein 1”.
LPS:	Lipopolisacárido.
Mφ:	Macrófago.
MHC I:	Complejo mayor de histocompatibilidad I, del inglés “major histocompatibility complex”.
NCI:	“National Cancer Institute”.
NK:	Célula asesina natural, del inglés “Natural Killer”.
Prf:	Perforina.
RE:	Retículo endoplasmático.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno.
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute.
SFB:	Suero fetal bovino.
Spb6b:	SerpinB6B.
TCR:	Receptor de antígeno de células T, del inglés “T cell receptor”.
Th:	Linfocito T colaborador.
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
TNFR:	Receptor del factor de necrosis tumoral.
Wt:	Wild type.

8.2 Estructura química de los compuestos con capacidad de inhibición de gzmA

- Compuesto con identificador 761431 (NSC):

Vemurafenib / Zelboraf/

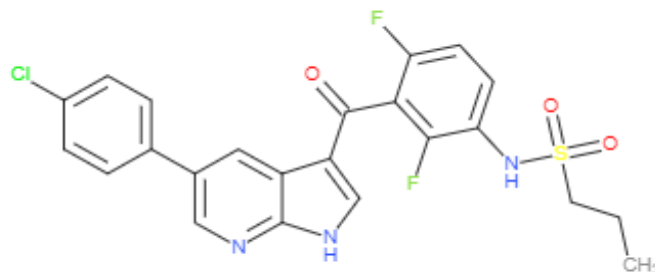
PLX4032 / RG7204

Formula molecular:

C₂₃H₁₈ClF₂N₃O₃S

Peso molecular:

489.9



- Compuesto con identificador 622690 (NSC):

PubChem SID 580980

Correspondiente a:

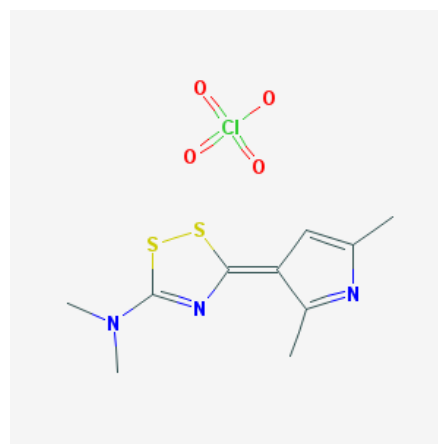
(5E)-5-(2,5-dimethylpyrrol-3-ylidene)-N,N-dimethyl-1,2,4-dithiazol-3-amine; perchloric acid.

Formula molecular:

C₁₀H₁₃N₃S₂.ClHO₄

Peso molecular:

340.0



- Compuesto con identificador 382766 (NSC):

PubChem SID 578123

Correspondiente a:

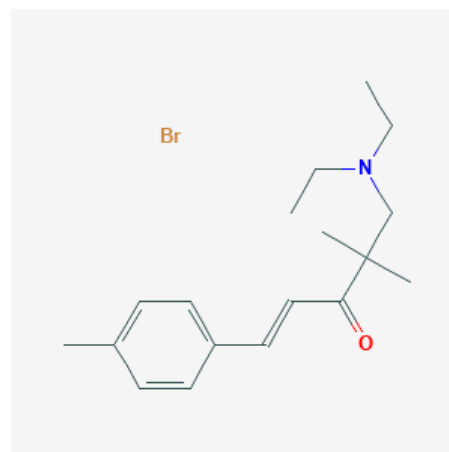
((E)-5-(Diethylamino)-4,4-dimethyl-1-(4-methylphenyl)pent-1-en-3-one hydrobromide).

Formula molecular:

C₁₈H₂₇NO.BrH

Peso molecular:

354.0



Ref: Catálogo de compuestos: National Cancer Institute NCI:
<https://wiki.nci.nih.gov/display/ncidtpdata/compound+sets>